

*Базарный В.В.¹, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2},
Гаврилов И.В.^{1,2}*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОЧЕТАННОЙ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЛАЦЕНТАРНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЕЕ РЕЗЕКЦИИ

¹ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский
университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация
²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. Целью исследования было изучить изменения биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на фоне проведения аллогенной сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) после резекции печени.

Материалы и методы. Выделение культуры ММСК и ГСК осуществлялось из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 22–23 г, срок гестации 18 дней. Мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной обработки ткани плаценты. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 и CD 117. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO₂ — инкубатора при температуре 37 °С с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК в дозе 4 млн клеток/кг и ГСК в дозе 330 тыс. клеток/кг. Введение клеток осуществлялось в физиологических условиях (без резекции печени) и через 1 час после субтотальной резекции печени. Производилась оценка биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 1, 3, 7 сутки после введения ММСК.

Результаты. В результате исследования получено, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК после резекции печени приводит к снижению уровня ферментов цитолиза (АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы), улучшению белоксинтетической функции печени (повышение показателей общего белка, уровня альбумина). Также после введения клеток на фоне резекции печени от-

мечено повышение площади ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматического индекса (ЯЦИ), количества двуядерных клеток. Повышение уровня митотической активности, снижение выраженности апоптоза привело к увеличению количества гепатоцитов.

Заключение. Обнаружено восстановление морфофункциональных свойств печени после ее субтотальной резекции на фоне аллогенной сочетанной трансплантации ММСК и ГСК. Это выражается в улучшении биохимических показателей периферической крови печени, и морфометрических показателей печени. При этом выявлена активация как клеточной регенерации, так и внутриклеточной.

Ключевые слова: резекция печени, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клеточная регенерация, внутриклеточная регенерация.

Известно, что после резекции способность печени к регенерации существенно увеличивается. При этом, активация регенерации органа происходит как на клеточном, так и на внутриклеточном уровнях [1]. При этом, обращает на себя внимание высокая летальность после обширной резекции печени, которая варьирует в диапазоне от 14 до 32% [2]. Это делает актуальным поиск эффективных способов восстановления регенерации печени после ее резекции. В нашем исследовании была использована сочетанная трансплантация аллогенных плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). ММСК можно сравнить с «фабрикой» по производству биологически активных веществ. ММСК способны вырабатывать различные факторы роста, противовоспалительные цитокины, синтезируют компоненты матрикса (фибронектин, ламинин, коллагены и протеогликаны) [3, 4]. При этом ММСК способны дифференцироваться в клетки стромы, которые обеспечивают синтез экстрацеллюлярного матрикса, формирующего микроокружение, необходимое для пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [5, 6]. Трансплантация ММСК способна ускорить процесс приживления ГСК и, соответственно, процесс восстановления регенерации тканей [7, 8, 9]. В последние годы доказана способность ГСК стимулировать регенерацию печени путем слияния с гепатоцитами [10]. Наличие у ММСК способности к выработке иммуносупрессивных факторов (ИЛ 10, TGF β) делает возможным проведение аллогенной сочетанной трансплантации ММСК и ГСК [11]. Перспективным источником для выделения данных видов клеток является плацента. Известно, что ткань зрелой плаценты человека содержит на порядок большее количество ГСК, чем пуповинная кровь и костный мозг [12]. Получение плацентарных ММСК и ГСК возможно неоперативным путем. Учитывая биологические свойства ММСК и ГСК представляется перспективным изучение их

влияния на регенерацию печени после ее резекции.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 84 белых лабораторных мышах-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 20-23 г. Производилось выделение культуры ММСК из хориона плаценты 5 лабораторных животных мышей-самок возраста 3-4 месяца, срок гестации 18 дней. Мононуклеарная фракция клеток была получена путем последовательной механической и ферментативной (раствор акутазы (Millipore, США)) обработки ткани плаценты. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 (StemCell Technologies, США) и CD 117 (StemCell Technologies, США) (X. Munira et al., 2009). Все эксперименты, уход и содержание осуществлялись в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 года Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». Выполнение исследований одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» протокол № 8 от 20.10.2017.

Культивирование ММСК проводилось в условиях CO₂ — инкубатора (Termo Scientific, США) при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Для трансплантации лабораторным животным были использованы ММСК третьего пассажа. Идентификация ММСК проводилась иммуноцитохимическим методом с использованием набора Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit (Millipore, США), содержащего позитивные (антитела к integrin β 1, CD 54, collagen type I и fibronectin) и негативные маркеры (антитела к CD 14, CD 45). Изучение функциональных свойств выделенных клеток было проведено путем направленной дифференцировки полученной культуры в направлениях, характерных для ММСК - в адипоцитарном и остеогенном. Идентификация ГСК была проведена на проточном цитометре Beckman Coulter Navios. В суспензии трансплантируемых клеток оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin- (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119). Содержание клеток после иммуномагнитной сепарации с иммунофенотипом CD117+, Sca-1+, Lin- составило 80-93%. Жизнеспособность клеток была определена с помощью суправитальной окраски раствором трипанового синего и перед трансплантацией составила 95–97%. Животным опытной группы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 4 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Животным контрольной группы вводили 0,9% раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после субтотальной резекции однократно. Резекция 2/3 печени у лабораторных мышей выполнена по методике С. Mitchell и Н. Willenbring [11]. Исследова-

лось влияние сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на биохимические показатели периферической крови и морфометрические показатели печени в физиологических условиях и после субтотальной резекции на 1, 3, 7 сутки. Из опыта животных выводили декапитацией под легким эфирным наркозом.

Изготавливали гистологические срезы печени толщиной 3-5 мкм, окрашивали гематоксилином-эозином. Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Biovision, Россия). С этой целью производили микрофотосъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (OLYMPUS, Япония) при увеличении $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 600$, $\times 1000$ (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе).

Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество гепатоцитов на 1 мм², площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцита, площадь цитоплазмы гепатоцита = площадь гепатоцита — площадь ядра гепатоцита, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм², митотический индекс (МИ), апоптотический индекс (АИ). Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) определяли, как отношение ядра и цитоплазмы клетки. Митотический, апоптотический индексы, выражали в промилле (‰). Митотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии митоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов. Верификация выраженности апоптоза осуществлялась с использованием метода ApopTag® Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) (Millipore, США). Апоптотический индекс определялся как отношение числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу подсчитанных гепатоцитов.

Оценка биохимических показателей периферической крови производилась на автоматическом биохимическом и иммуноферментном анализаторе Chem Well 2910 (Combi). Изучались следующие биохимические показатели: общий белок (биуретовая реакция), альбумин (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазо-салицилат-гипохлоритный метод, реакция Бертлота), глюкоза (реакция Триндера), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ). При определении биохимических показателей использовались наборы компании «Ольвекс Диагностикум», Россия.

Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Результаты исследования

При анализе биохимических показателей периферической крови и мор-

фометрических показателей печени у лабораторных животных без резекции печени на 1, 3, 7 сутки после сочетанного введения ММСК и ГСК достоверных различий с контрольной группой не обнаружено.

При изучении биохимических показателей периферической крови и морфометрических показателей печени на 1 сутки после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК отличий от данных контрольной группы также как в физиологических условиях не выявлено.

На 3 сутки после резекции печени на фоне введения плацентарных ММСК и ГСК у лабораторных животных выявлено снижение показателей АСТ на 23,7%, АЛТ на 24, 0%, щелочной фосфатазы на 22,3% (таблица 1).

Анализируя биохимические показатели периферической крови лабораторных животных на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК отмечено повышение общего белка, альбумина, мочевины, повышение уровня глюкозы. Также отмечено снижение уровня ферментов: АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы до значений интактных животных (таблица 2).

Таблица 1

Биохимические показатели крови лабораторных мышей на 3 сутки после субтотальной резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n=7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Общий белок, г/л	50,03±4,82 *	54,1±4,83 *
Альбумин, г/л	19,80±2,51 *	21,71±1,79 *
Мочевина, ммоль/л	4,37±0,33 *	4,54±0,69 *
Глюкоза, ммоль/л	3,66±0,29 *	3,71±0,36 *
Общий билирубин, мкмоль/л	21,99±5,47 *	19,84±1,85 *
АСТ, Ед/л	209,53±13,85 *	159,83±15,8 * **
АЛТ, Ед/л	155,24±9,38 *	117,94±10,95 * **
Щел. Фосфатаза, Ед/л	106,67±10,45 *	82,90±11,34 * **

Примечание: * отличие от интактной группы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p<0,05$; ** отличие от контрольной группы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p<0,05$.

Таблица 2

Биохимические показатели крови зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n=7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Общий белок	44,27±3,62 *	54,10±3,69 * **
Альбумин	20,59±1,90 *	25,03±3,74 * **
Мочевина	4,57±0,46 *	5,77±0,48 **
Глюкоза	4,30±0,29 *	5,20±0,34 * **
Общий билирубин	15,41±2,76 *	14,06±1,28 *
АСТ	153,86±16,96 *	111,94±12,04 **
АЛТ	137,10±16,29 *	96,24±9,21 **
Щел. фосфатаза	83,11±5,93 *	65,59±3,73 **

Примечание: * отличие от интактной группы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной группы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При изучении морфометрических показателей печени на 3 сутки после резекции печени у животных, которым вводили ММСК и ГСК обнаружено увеличение площади ядра гепатоцитов на 25, 1%, повышение ЯЦИ на 20,0%, повышение количества двуядерных клеток на 24,2%. Также выявлено снижение апоптотического индекса на 25,5% (таблица 3).

Таблица 3

Морфометрические показатели печени зрелых лабораторных мышей на 3 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n=7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	2489,91±66,89 *	2557,0±77,71 *
Площадь гепатоцитов, мкм ²	331,81±24,02 *	338,0±20,57 *
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	67,13±7,01 *	84,0±8,29 * **
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	243,64±19,25	254,0±12,29
ЯЦИ	0,27±0,01*	0,33±0,02 * **
Количество двуядерных гепатоцитов на мм ²	380,97±10,15 *	473,14±23,55 * **
МИ, %	8,1±0,60 *	8,2±0,49 *
АИ, %	2,13±0,20*	1,59±0,13* **

Примечание: * отличие от интактной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

При анализе морфометрических показателей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК в опытной группе отмечено повыше-

ние количества гепатоцитов на 21,5%, повышение площади ядра гепатоцитов на 20,9%, возрастание ЯЦИ на 28,43%, увеличение количества двухядерных клеток на 22,3%. Также отмечено увеличение митотического индекса на 27,2% и снижение апоптотического индекса на 26,6% (таблица 4).

Таблица 4

Морфометрические показатели печени зрелых лабораторных мышей на 7 сутки после резекции печени на фоне введения ММСК и ГСК, $M \pm m$, $n = 7$

Показатели	Значение	
	NaCl	ММСК+ГСК
Количество гепатоцитов на 1 мм ²	1918,29±82,04 *	2330,14±112,98* **
Площадь гепатоцитов, мкм ²	286,41±22,44	289±23,63
Площадь ядра гепатоцитов, мкм ²	63,39±5,12 *	78,07±6,32* **
Площадь цитоплазмы гепатоцитов, мкм ²	223,03±17,97	211,36±17,52
ЯЦИ	0,29±0,02 *	0,37±0,01* **
Количество двухядерных гепатоцитов на мм ²	320,77±10,64 *	392,43±20,94* **
МИ, ‰	4,51±0,47 *	5,74±0,49* **
АИ, ‰	1,25±0,09*	0,92±0,09* **

Примечание: * отличие от интактной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$; ** отличие от контрольной подгруппы зрелых лабораторных животных, достоверно с $p < 0,05$.

Заключение

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК способна активировать регенерацию печени после ее субтотальной резекции. Введение данных видов клеток обеспечивает восстановление белоксинтетической функции печени, нормализация показателей ферментов цитолиза. Изменения со стороны структуры печени в ответ на сочетанную трансплантацию клеток выражаются в активации механизмов клеточной и внутриклеточной регенерации, снижении выраженности апоптоза. Уменьшение запрограммированной клеточной гибели гепатоцитов можно объяснить способностью ММСК индуцировать в них выработку белков теплового шока путем формирования межклеточных контактов. Белки теплового шока в свою очередь, повышают устойчивость структурных и функциональных белков от разрушения. Обеспечивая таким образом, устойчивость ферментов репарации, достигается антиапоптогенный эффект. Активация внутриклеточной регенерации может быть обусловлена сливанием ММСК и ГСК с гепатоцитами. Способность ММСК к выработке факторов роста (SCF, HGF) обеспечивает активацию клеточной регенерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michalopoulos G.K. Liver regeneration // *J. Cell Physiol.* – 2007. – V. 213, № 2. – P. 286–300.
2. Badgwell, B., Ribeco D., Vauthey, J. (2008). Surgical Management (Resection). In J. Geschwind and M.Soulen (Eds), *International Oncology: Principles and Practice* (pp. 121-134). Cambridge: Cambridge University Press. Doi: 10.1017/CB09780511722226.013
3. Prockop D.J., Oh J.Y Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation // *Mol. Ther.* – 2012. – Vol. 20(1) – P.14-20.
4. Sun L., Fan X., Zhang L. et. al. Bone mesenchymal stem cell transplantation via four routes for the treatment of acute liver failure in rats // *International journal of molecular medicine.* - 2014. - 34. - 987-96.
5. Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11: 360-371 [PMID:22893462 DOI: 10.1016/S1499-3872(12)60193-3].
6. Ikebe C., Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols // *Biomed Research International.* 2014. P.951512.
7. Maklakova, I.Y. Effects of combined transplantation of multipotent mesenchymal stromal and hemopoietic stem cell on regeneration of the hemopoietic tissue / I.Y. Maklakova, D.Y. Grebnev // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2017. – Vol. 163, №1. – P. 61-64.
8. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2015. Т. 59. № 4. С. 82-86.
9. Сазонов С.В. Т-лимфоциты регуляторы активности пролиферации клеток в ткани (научный обзор) / *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2007. № 1. С. 91-94.
10. Pilat N., Unger L., Berlakovich G. A. Implication for Bone Marrow Derived Stem Cells in Hepatocyte Regeneration after Orthotopic Liver Transplantation/ Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Hepatology.* Vol. 2013, Article ID 310612, P. 7
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/310612>.
11. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014. Vol. 15. P. 1009–1016.
12. Сериков В.Б., Куйперс Ф. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* Том III. № 9 2008. С. 51-56.